

**Die Aktivität der
Bernsteinsäuredehydrase bei
experimenteller Leberschädigung**

Herbert Groebl

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Die Aktivität der
Bernsteinsäuredehydrase bei
experimenteller Leberschädigung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert Groebl
aus München

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. N. ZÖLLNER
Correferent:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.1961



Bei Untersuchungen der Lebensvorgänge, pflanzlicher oder tierischer Natur, findet man, dass chemische Umwandlungen stattfinden und als das hervorragende Kennzeichen des lebenden Organismus angesehen werden können.

So betrachtet sind z. B. Verdauung und Stoffwechsel chemische Prozesse, die dem Körper zum Aufbau und Erhaltung seiner Funktionen die erforderliche Energie liefern. Nun ist aber bemerkenswert, dass fast alle chemischen Umwandlungen, die in einer lebenden Zelle stattfinden, im allgemeinen zu langsam ablaufen um messbar festgehalten werden zu können. Wodurch werden aber dann diese Energien mit der notwendigen Geschwindigkeit, wie sie von dem Organismus tatsächlich gebraucht werden, gewonnen?

Heute wissen wir, dass diese Prozesse des biologischen Auf- und Umbaues nur deshalb so schnell verlaufen, weil Stoffe einwirken, die wir als Katalysatoren bezeichnen. Ein Katalysator ist nach Ostwald's klassischer Definition "ein Agens, das die Geschwindigkeit einer Reaktion bestimmt, ohne selbst im Endprodukt zu erscheinen". Wir kennen dieses Phänomen aus der organischen Chemie, wo z. B. fein verteiltes Metall, wie Platin, Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff verwandelt. Untersuchen wir die Eigenschaften dieser Katalysatoren, so wird festgestellt, dass die Anwesenheit dieser "Beschleuniger" die Ablaufgeschwindigkeit, nicht aber das Ausmass oder die Richtung bestimmen. So kann bei reversiblen Reaktionen ein Katalysator in beiden Richtungen die Ablaufgeschwindigkeit beeinflussen. Ein weiteres signifikantes Merkmal der Katalysatoren ist ihr verschwindend geringer Anteil zur Menge die sie umzusetzen vermögen; so genügen schon winzige Spuren für beträchtliche Umwandlungen. Zwar kennen wir das Wirken dieser "biologischen" Katalysatoren schon längst und die Menschen hatten sich schon immer dieser Stoffe bedient.

Es war aber Louis Pasteur, dem als ersten der Nachweis eines solchen "Lebensstoffes" gelang und er nannte ihn Ferment. Es sei jedoch an Mikroorganismen gebunden, da die fermentative Wirkung bei seinem Versuch nur in Gegenwart von lebenden Hefezellen vor sich ging. Im Jahre 1897 konnten dann die Brüder Buchner in ihren berühmt gewordenen Experimenten nachweisen, wie auch chemische Umwandlungen noch stattfinden, selbst wenn das sogenannte Ferment von den Zellen getrennt wird. Sie zerstörten die lebenden Hefezellen durch Zerreiben mit Diatomeenerde und Auspressen und bei einem Druck von 300 Atm. Der dabei gewonnene Fermentsaft, der frei von lebenden Zellen war, hatte noch dieselben katalytischen Eigenschaften, d. h. er konnte noch Zucker zu Alkohol und Kohlendioxyd fermentieren. Diesen Hefepressaft nannten sie Enzym. Es war damit zum erstenmal möglich geworden, unabhängig von lebenden Zellen, diese biologischen Katalysatoren zu studieren. Damit war der Grundstein für die Enzymforschung gelegt (3, 6, 14, 26).

Die Forschung, die nun einsetzte, begann sich für die differenzierte Wirkungsweise, Eigenschaften, chemische Zusammensetzung, Beeinflussbarkeit, besonders aber für ihre unentbehrliche Gegenwart bei chemischen Umwandlungen im menschlichen Organismus zu interessieren. Es gelang in kurzer Zeit ein vollkommen neues Gebiet zu erschliessen, das speziell den Chemismus der Zelle betrifft. Als eine logische Entwicklung kann man es heute ansehen, wenn sich daraus ein neuer Zweig der Chemie entwickelt hat, die "Biochemie". Obgleich sie im Rahmen der physiologischen Chemie gehört, so hat sie doch wesentlich dazu beigetragen, eine engere Verbindung von Chemie und Medizin zu schaffen. Während früher bei chemischen Umwandlungen nur die Ausgangs- und Endprodukte einer Reaktion erfasst werden konnten, so ist es heute mit den Erkenntnissen über die Wirkung der Fermente möglich, komplizierte Reaktionen aufzugliedern und abschnittsweise zu verfolgen (4). Wir gewannen dadurch Einblick in die Einzelaktionen im menschlichen Körper, wir wissen vor allem auf welche Weise er seine Energie bezieht (11, 44, 45). Wenn wir als typisches Beispiel das Ausgangsprodukt Glykogen im Muskel wählen, so finden wir eine Reihe von chemischen Reaktionen im Körper, die in anaeroben Zerfall Energie liefern. Als Endprodukt entsteht Milchsäure, welche in einer aeroben Phase wieder zu Glykogen synthetisiert wird.

"Die Vielfältigkeit des Chemismus der lebenden Zelle liegt darin begründet, dass für jede spezifische Zell-Leistung eine spezifische chemodynamische Zellmaschine besteht, welche die im Augenblick benötigte Menge von freier Energie zu produzieren vermag" (Oppenheimer).

Als Beispiel das Schema für den Glykogenabbau nach Emden Meyerhof, erweitert durch Cori:

Glykogen - Phosphat - Phosphorylase - Glukose-1-Phosphat	
	Phosphoglukomutase
Glukose - Phosphat - Phosphatase - Glukose-6-Phosphat	
	Isomerase
	Fruktose-1,6 Diphosphat
	Aldolase
	1 Phosphodihydroxyaceton
	Isomerase
	3 Phosphoglyceroaldehyd
	1,3-Phosphoglyceroaldehyd
	Triosephosphatdehydrase
	1,3-Diphosphoglycerinsäure
2 Phosphoglycerinsäure -- Phosphoglyceromutase -- 3-Phosphoglycerinsäure	
Phosphorbrenztraubensäure -- Brenztraubensäure -- Milchsäure	

Wir müssen die Katalysatoren, mit denen sich unsere Versuche beschäftigen, näher untersuchen und vergleichen inwiefern wir unsere Erfahrung über die Dynamik der anorganischen Katalysatoren auch auf sie beziehen dürfen.

Ein von der lebenden Zelle produziertes Ferment wirkt ebenfalls nur durch seine Gegenwart und trägt zu der beeinflussten Reaktion scheinbar keine messbare Energie bei; es findet sich daher am Ende einer Reaktion meistens unverändert wieder. Dennoch besteht hier ein Unterschied gegenüber den metallischen Katalysatoren, da sich die physikalischen Eigenschaften geändert haben. Das ist aber dadurch bedingt, dass das Ferment durch die Produkte, die es katalysiert hat, gehemmt wird, d. h. durch physikalische Veränderungen nicht mehr wirksam sein kann. Ein anderer Gegensatz im Vergleich zu metallischen Katalysatoren ist der Initialeffekt von Fermenten. Anorganische Katalysatoren können nur die Geschwindigkeit einer schon im Gang befindlichen Reaktion verändern (beschleunigen); Fermente dagegen eine Reaktion einleiten. Gemeinsam besitzen beide Arten von Katalysatoren das Charakteristikum, dass nur minimale Mengen erforderlich sind um ihre besondere Funktion auszuüben. Wir wissen, dass die Temperatur bei einer chemischen Reaktion ein ausschlaggebender Faktor ist, so bewirkt die Erhöhung derselben eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, eine Erniedrigung, eine Verlangsamung. Soweit zeigen die Fermente keine Abweichung was den Temperaturfaktor anbetrifft, dies gilt aber mit einer Einschränkung, sie werden bei hohen Temperaturen inaktiviert. So kann von einer optimalen Temperatur eines Enzyms gesprochen werden, d. h. von einem Temperaturbereich in dem bei sonst konstanten Verhältnissen die grösste Menge chemisch umgesetzt wird. Die optimale Temperatur der meisten Enzyms liegt zwischen $30 - 40^{\circ}\text{C}.$, was bei der Bestimmung der Aktivität eines Fermentes unbedingt berücksichtigt werden muss. Würde demnach die verwendete Temperatur oberhalb 40°C liegen, so würde zwar anfänglich die Aktivität positiv beeinflusst werden, jedoch vorzeitig zum Erliegen kommen. Unter 30°C würde das Enzym wohl länger stabil bleiben, die Reaktion aber verzögert, also nicht in der erforderlichen Geschwindigkeit ablaufen.

Insbesondere aber bedürfen die katalytischen Kräfte der Enzyms einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration um aktiv zu sein, manche wirken nur in einem sehr limitierten pH-Bereich. Man findet, dass der optimale pH-Wert als charakteristisch für ein Enzym angesehen werden kann. Auch dabei können Änderungen die Aktivitätskurve beeinflussen (2, 42, 31, 39).

Aus allen diesen Feststellungen darf geschlossen werden, dass es sich um Proteine handelt. Tatsächlich sind auch alle Enzyme, die zu isolieren und in reiner Form darzustellen es bisher gelang, Proteine. Wenn auch nicht alle davon in ihrer Gesamtheit Proteine sind, manche sind nur mit einem proteinartigen Fragment der sogenannten prothetischen Gruppe verbunden, so müssen sie ihrem Wesen nach doch als Eiweisskörper angesehen werden. Sie können deshalb durch Salze der Schwermetalle gehemmt bzw. denaturiert werden. Die gleiche Wirkung kann auch durch alkaloidale Reagenzien erreicht werden, wie Phosphorwolframsäure, die im Gegensatz zu den ersteren Fällungsmitteln durch ihre negativ geladenen Ionen wirkt. Genaue Überprüfungen in dieser Richtung ergaben, dass die Aktivität eines

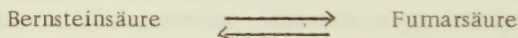
Enzyms umgekehrt proportional zur Menge des eingebrachten Fällungsmittels ist. Schliesslich sprechen auch die schädigenden Einflüsse von ultravioletten Strahlen für den Eiweisscharakter der Enzyme (8, 17, 18).

Eines der signifikanten Eigenschaften der Enzyme ist deren Spezifität. Darunter versteht man, dass ein Enzym nur bestimmte Reaktionen, oft sogar nur eine, katalysieren kann. Das zeigt sich besonders bei optisch aktiven Stoffwechselprozessen, wo von zwei möglichen stereo-isomeren Formen selektisch nur eine katalysiert wird.

Die Bestimmung der Enzymaktivität geschieht durch Messung der Menge, die durch einen katalysierten chemischen Prozess umgewandelt wird. Wir bringen das Enzym mit einem Substrat zusammen, die notwendigen Bedingungen (Temperatur pH-Wert usw.) vorausgesetzt, und messen in Abständen durch Entnehmen von Proben den Reaktionsablauf. Die durch die Proben erhaltenen Werte geben uns einen genauen Aufschluss über die Aktivität eines Enzyms (1, 38, 46).

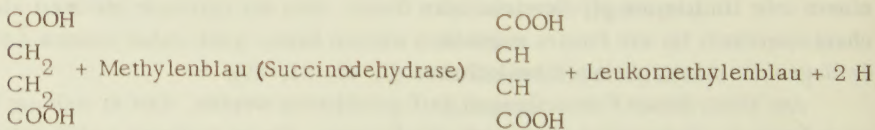
Die Bernsteinsäuredehydrase

Für unsere Versuche über die Bestimmung der Aktivität eines Enzyms wurde die Bernsteinsäuredehydrase gewählt. Durch die Arbeiten von Thunberg kennen wir die katalysierte Reaktion:



Dabei geschieht die Oxydation der Bernsteinsäure zur Fumarsäure wie bei allen organischen Substanzen durch Dehydrierung, ein Oxydationsvorgang, bei dem Wasserstoffatome einer chemischen Verbindung entzogen werden. Hierzu aktiviert, d.h. lockert die Bernsteinsäuredehydrase den paarweise gebundenen Wasserstoff des Substrats um ihn einem geeigneten Wasserstoffacceptor zuzuführen.

Verwendet man Methylenblau, so kann die Reaktion folgendermassen ablaufen:



Das Enzym funktioniert als der Wasserstoffträger. Es arbeitet in einem cyclischen System, d.h. es wird fortlaufend hydriert und dehydriert und bewirkt die chemische Umwandlung ohne in der Bilanz in Erscheinung zu treten.

Ein anderer Wasserstoffacceptor ist das Cytochrom C. In diesem Fall wirkt das Bernsteinsäuredehydrase - Cytochromoxydase-System und Sauerstoff wird verbraucht:

(1) Succinat

Fumarat + 2 H

Fe + + +

Fe + +

(2) 2 Cytochrom C + 2 H $\rightleftharpoons$ 2 reduziertes Cytochrom C + 2 H

(3) 2 reduziertes Cytochrom C + 2 H + $\frac{1}{2}$ O₂ $\xrightarrow{\text{Cytochromoxydase}}$
2 Cytochrom C + H₂O.

Das Cytochrom C besteht aus einer eisenhaltigen, proteinartigen, prosthetischen Gruppe, ist jedoch wie die meisten Enzyme an ein spezifisches Protein gebunden. Es gibt Anhaltspunkte, die für ein Flavin als Wasserstoffüberträger sprechen. Die Beteiligung der eisen-haltigen Gruppe ---- ähnlich dem Haem des Haemoglobins ---- ist daran zu erkennen, dass die Reaktion durch Cyanid vollkommen gehemmt wird. Eisen bildet bekanntlich mit Cyanid eine schwerlösliche Verbindung. Cytochrom C besitzt im Gegensatz zu anderen Enzymen nicht die Eigenschaft selbst zu oxydieren. Da dies in dem Reaktionsablauf dennoch geschieht, wird durch ein weiteres Ferment ---- der Cytochromoxydase ---- bewirkt. Es katalysiert die Übertragung der Elektronen an den Sauerstoff. Es besteht kein Zweifel, dass bei diesem komplizierten Reaktionsgeschehen die Oxydo-Reduktionskatalysatoren sich kurzzeitig mit den Elektronendonatoren verbinden. So konnte bei der Succinodehydase nachgewiesen werden, dass sie den Austausch des Alpha-Atoms des Succinats zum Lösungsmittel katalysiert, was für eine lose Bindung des Ferments mit dem Alpha-Atom spricht. Das oxydierte Cytochrom C wird wiederum durch die Succinodehydase in Gegenwart ihres Substrats reduziert (21, 22, 43).

Das Enzym Bernsteinsäuredehydrase ist wie bislang alle gefundenen Enzyme ein Protein. Es zeigt daher auch die Eigenschaften eines solchen, wie Denaturierung durch Salze der Schwermetalle oder durch UV-Strahlen. Es ist hochspezifisch, unlöslich und wird durch 2-basische Säuren, wie die Malon-Äpfel- und Oxalessigsäure kompetitiv gehemmt. Seine Aktivität ist abhängig von der Intaktheit der S-H Gruppen. Wenn diese eine S-S Bindung bilden, tritt ebenfalls eine Hemmung ein. Weiter kann eine hohe Konzentration von Monoiodacetat, welches eine irreversible Verbindung mit den S-H Gruppen eingeht, hemmend wirken.

Thunberg hatte bei seinen Studien über die oxydativen Vorgänge der organischen Verbindungen durch lebende Zellen 1909 die Bernsteinsäuredehydrase entdeckt. Später konnten dann Batelli und Stern durch unabhängige Beobachtungen seine Entdeckung bestätigen.

Das Enzym ist in allen Organen nachzuweisen, jedoch bestehen zwischen den einzelnen beträchtliche Unterschiede, wobei die Leber eine Sonderstellung einnimmt.

Neuere Forschung über die Lokalisation der Bernsteinsäuredehydrase (K. H. Neumann und G. Koch) ergaben, dass der Zellkern frei von Enzym ist (34). Versuche durch Isolieren der Zellkerne haben diese Anschauungen bestätigen können (25).

(K. Lang und G. Siebert). Träger der Bernsteinsäuredehydrase ist das Cytoplasma; dabei kann enzymatisch gebildetes Formazan (geprüft wurde das Reduktionsvermögen des Tetrazoliumchlorids nach Entfernen der gewebseigenen Wasserstoffdonatoren aus der Bebrütungslösung und Zusatz von Bernsteinsäure und eines Reduktionsindikators) -- in zweierlei Form vorliegen: diffus verteilt in Lipide gelöst oder aber ausgefällt in Form kleiner Kristalle oder Granula (12). Die Lokalisation der Fermentwirkung ist durch Ablagerung roter Formazankristalle markiert (12, 23). Das bei diesen Versuchen zugesetzte Substrat: Bernsteinsäure, führt zu keiner stärkeren Reaktion, sondern nur zur Erfassung des spezifischen Enzyms. In der Fraktion der Mitochondrien findet sich etwa 75 % der Aktivität, was für eine sehr enge Bindung der Bernsteinsäure an die Mitochondrien spricht. Dieser Tatsache wurde durch Verwendung der Bernsteinsäuredehydrase in Homogenatform bei unseren Versuchen weitgehend Rechnung getragen (5, 13, 27).

Die hervorragende Bedeutung dieses Enzyms wird erkenntlich, wenn wir die Bernsteinsäuredehydrierung in dem Tricarbonsäurecyclus betrachten. Die Arbeiten von Szent-Györgyi haben die Grundlagen für diese Vorstellung geschaffen. Heute wissen wir, welche Bedeutung der Tricarbonsäurecyclus, auch Zitronensäurecyclus genannt, im Stoffwechselgeschehen hat. Nach dem Schema von Krebs führt die Reaktionskette von der Zitronensäure über Alpha-Ketoglutarinsäure - Bernsteinsäure - Fumarsäure - Apfelsäure - wieder zur Oxalacetatsäure, worauf der Cyclus von neuem beginnt. Mit jedem Drehen des Rades tritt ausserdem noch ein Molekül Brenztraubensäure ein, 3 Moleküle CO_2 werden gebildet, während ein Molekül Brenztraubensäure verbraucht wird. 5 Wasserstoffatome werden frei bei einem Ablauf des Cyclus, die mit den Wasserstoffacceptoren in Reaktion treten. Dieser Reaktionscyclus hat einen wesentlichen Anteil am Abbau (Oxydation) von Glukose und Glykogen. Aber auch die Fettsäuren werden auf dem Wege über die Ketokörper teilweise in diesem Cyclus abgebaut. Schliesslich hat er auch noch eine Bedeutung bei der Eigensynthese der Eiweisskörper (Aminosäuren) durch Aminierung von Brenztraubensäure, Oxalacetatsäure und Alpha-Ketoglutarinsäure (20, 24, 31).

Da die Forschung bestrebt war, die katalysierten Oxydationsvorgänge in der Zelle und damit die Aktivität des Enzyms messbar zu erfassen, wurden verschiedene Bestimmungsmethoden entwickelt. Heute kann die Enzymaktivität mit relativ einfachen Methoden gemessen werden.

Wieland hatte nachgewiesen, dass zellfremde Acceptoren den Sauerstoff in seiner Rolle vertreten können. Als solche kamen in erster Linie chinoiden Verbindungen in Betracht, welche durch Hydrierung in ein benzoides System übergehen. Es sind dies Farbstoffe der Thiazinreihe, von denen besonders das Methylenblau heute verwendet wird (30, 32).

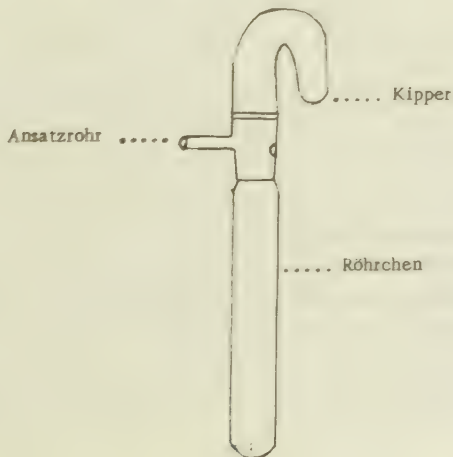
THUNBERG TECHNIK

Wir verdanken Thunberg die Entwicklung einer genial einfachen Methode: Lebende Zellen oder Extrakte aus Zellgeweben oxydieren organische Verbindungen. Diese Dehydrogenasen sind aber auch in der Lage, Methylenblau zu reduzieren. Die Reduktion dieses Farbstoffs zeigt sich in einer Entfärbung, d.h., Umwandlung in Leukomethylenblau. Die Entfärbung findet aber nur im Innern der Lösung statt, während die Oberfläche keine Reduktion aufweist. Dies beruht darauf, dass Methylenblau in der Atmosphäre ständig reoxydiert wird. So muss bei diesen kolorimetrischen Methoden unter Luftabschluss gearbeitet werden. Durch die von Thunberg eingeführte Vakuumtechnik ist es möglich, die Aktivitätsbestimmung relativ genau durchzuführen. Die Thunberg Röhrchen können luftleer gemacht und verschlossen werden.

Ausführung

Im Röhrchen befindet sich das Reaktionsgemisch (Substrat Methylenblau), im Kipper das Enzym (Homogenat).

Die Messung beruht darauf, dass eine gegebene Menge dieser Acceptorsubstanz in einer Reihe von Versuchsansätzen, Substrat verbraucht. Aus der Farbintensität und seiner Abnahme kann die Geschwindigkeit und Fortschritt einer Reaktion visuell verfolgt werden. Bestimmt werden in Einzelsätzen die Entfärbungszeiten, d.h., Zeitabläufe bis eine gegebene Menge Enzym, bei bestimmter Donatorkonzentration eine bekannte Menge Methylenblau in Leukomethylenblau übergeführt ist. Die Technik wird vor allem bei Versuchen angewandt, wo manometrische Sauerstoffmessungen wegen zu geringer Ausschläge nicht angezeigt erscheinen. Sie bietet den Vorteil, dass die Farbintensität auch bei schwachen Konzentrationen noch gegeben ist. Sie liefert in den Zahlenverhältnissen ihrer Umsätze; d.h., durch die Entfärbungszeiten, Werte, die in direkte Beziehung zu den entsprechenden organischen Vorgängen in der Zelle gesetzt werden dürfen.



Eine andere Möglichkeit, die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase zu bestimmen, bietet sich in der Technik von Warburg.

Wie schon oben erwähnt, ist Cytochrom C der Wasserstoffacceptor. Der hierbei verbrauchte Sauerstoff wird mit der Warburg-Apperatur gemessen. Die Darstellung der gleichzeitig nebeneinander ablaufenden Reaktionen wurde bereits angegeben. In diesem komplizierten Reaktionsablauf ist erwähnenswert, dass aus allem Wasserstoff Wasser entsteht. Cytochrom C kann deswegen immer wieder in die Reaktion eintreten, es erscheint, genau wie im Zellgeschehen, als der natürliche Wasserstoffacceptor und Überträger Bernsteinsäuredehydrase.

Beschreibung

Die Warburg-Apperatur ist mit einem Manometer versehen, das mit einem Atmungsgefäß (Ansatztrog mit Seitenarm) durch Schliffassung verbunden, die Kapillare über einen Gummischlauch kommuniziert. In beiden Teilen befindet sich Brodie-Lösung. Durch Drehen einer Schraube an dieser Vorrichtung kann der Flüssigkeitsspiegel jederzeit auf den Nullpunkt eingestellt werden. Das Ansatz-(Reaktions)gefäß wird durch einen Glasstopfen, bei bestimmter Stellung, verschlossen. Das Manometer ist mit einem Schliffhahn ausgestattet, der den Druckausgleich mit der umgebenden Atmosphäre nach Versuchsbeendigung herzustellen gestattet. Die an die Manometer angebrachten Reaktionsgefäße befinden sich nach Einstekken an die Apperatur in einem Thermostatenwasser und werden durch eine Schüttelvorrichtung in horizontaler Richtung bewegt. Die Manometer mit den Reaktionsgefäßen müssen vor den Versuchen mittels Quecksilber geeicht werden. Eines der Manometer dient stets zur Temperaturkontrolle und wird mit dem entsprechenden Volumen Wasser beschickt. Nach einer Aequilibration von 10 Minuten werden die Hähne der Manometer rasch geschlossen. Die Ablesung erfolgt in bestimmten Zeitintervallen, dabei wird der mit der Gasatmosphäre verbundene Schenkel bis zur Nullmarke gesenkt. Die Differenz wird dann am anderen Schenkel abgelesen und mit der dazu gehörigen Zeit auf einer Tabelle eingetragen.

In unseren Versuchen sollte die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase, eines der wichtigsten Enzyme in der Leber in menschlichen und tierischen Körper, nach Einbringen von schädigenden Substanzen (Lebergiften) studiert werden.

Es war dabei unser Bestreben, pathologische Veränderungen im Zellgeschehen enzymatisch zu erfassen, um Vergleiche über die Aktivität der Enzyme unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu ziehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit, sollten eine fernere Aufgabe über die gestörte enzymatische Funktion der Leber in pathologischen Fällen beim Menschen vorbereiten.

Die Morphologie der experimentell geschädigten Leber

Eine intensive Erforschung der Lebererkrankungen in den letzten Jahrzehnten - durch klinische Beobachtungen-unterstützt durch experimentelle Studien, hat unser Wissen über die Pathologie dieses Organs wesentlich bereichert.

Die Klinik bediente sich dabei der "puncture biopsy", um morphologische Veränderungen der Leber zu erkennen. Gleichzeitig war man bemüht, durch Versuche an Tieren dieselben morphologischen Bilder zu erzeugen, um eine gewisse Analogie herzustellen. Dazu mussten Laesionen gesetzt werden, die eine Erkrankung der Leber hervorrufen. Solche können wir auf verschiedene Weise erzeugen; die einfachste und in unseren Versuchen angewandte, ist das Einbringen von sogenannten Lebergiften (41). Wir benutzten Tetrachlorkohlenstoff, der subcutan appliziert wurde.

Der unmittelbare, spezifische Effekt auf so ein komplexes Organ wie die Leber hat gezeigt, dass die hochdifferenzierten Zellen, die das Organ für seine charakteristische Funktion ausrüsten, am meisten empfindlich für Schädigungen sind. Aus der Histologie wissen wir, dass neben der Gefäßstruktur für die Versorgung es besonders die Parenchymzellen sind, die das Organ für seine Sonderfunktion braucht. Weiter finden wir, wenn auch wenig charakteristisch, die Zellen der Gallengänge; am wenigsten differenziert schliesslich die Kupferzellen, welche zum reticulo-endothelialen System gehören (7, 10).

Bei einer entsprechenden Dosierung von Tetrachlorkohlenstoff (0.05/100.0 Körpergewicht) entsteht eine Nekrose einer oder mehrerer anatomischen Formen. Dabei betrifft die Nekrose nur die Parenchymzellen wie klinische und experimentelle Erfahrungen zeigen. Vorwiegend konnten wir eine zonale Nekrose beobachten, die begrenzt ist. Je nach ihrer Lokalisation spricht man von einer zentrilobulären, periportalen oder direkt-zonalen Nekrose. Sie betrifft aber immer die ganze Leber und kann in jedem Leberlappen nachgewiesen werden. Wir konnten dabei die Beobachtungen anderer Autoren (Gardner) bestätigen, die das Auftreten einer solchen Schädigung in der Leber 12 Stunden nach Einbringen des Giftes und eine maximale nach 48 Stunden gesehen hatten. Dazu muss gesagt werden, dass das Ausmass der pathologischen Veränderungen direkt proportional der Menge des applizierten Giftes ist. Bei sehr hoher Dosierung entsteht eine massive Nekrose, die dem Krankheitsbild der "gelben Leberatrophie" entspricht, in diesem Falle sind alle Parenchymzellen zerstört. Die Ausdehnung einer Nekrose wird auch noch durch andere Faktoren bestimmt. So findet man bei wiederholten Applikationen eines Giftes eine massive Nekrose, oft auch eine Fibrose, die die Folge von wiederholt aufgetretenen Nekrosen ist. Allgemein gesehen, ist die Nekrose die akute Form, die Fibrose die chronische Form der Lebererkrankung (28). Demnach reagiert das Leberparenchym in der ersten Phase der Gifteinwirkung mit einer zonalen Nekrose. Diese Tatsache ist von pathoprognostischer Bedeutung, wenn wir die Re-

parationsfähigkeit der Leber betrachten (9). So sind selbst nach einer schweren Nekrose Reparationen von verblüffender Schnelligkeit und Vollständigkeit gesehen worden. Dagegen zeigten fibrotische Veränderungen keine Rückbildung, da anscheinend die Reparationsfähigkeit der Leber zerstört war (11, 19).

Diesen pathologischen Veränderungen im Zellgewebe, wie sie durch angefertigte histologische Schnitte kontrolliert wurden, entsprechen auch Störungen im Stoffwechsel der Leber, wie uns aus klinischen Untersuchungsmethoden bekannt ist. Durch andere Arbeiten wissen wir, dass auch enzymatische Störungen auftreten, die aber anscheinend in keinem zeitlichen Zusammenhang mit dem morphologischen Geschehen stehen. Auch in dem Wiederansteigen der Fermentaktivitäten zeigt sich das Reparationsvermögen der Leber. Jedoch besteht auch hier eine zeitliche Diskrepanz, wobei die Reduktionsfähigkeit der Zelle das erste Anzeichen einer beginnenden Regeneration war.

In unseren Untersuchungen sollte ein Ferment, die Bernsteinsäuredehydrase, die eine fundamentale biochemische Reaktion in Leber katalysiert, bei einer hepatischen Nekrose untersucht werden. Wir wollten Aufschlüsse erhalten, die wir für das Verstehen von menschlichen Krankheitsbildern, die sich auf die Leber beziehen, verwenden können.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Homogenatmethode:

Die Tatsache, dass die Mitochondrien und das Protoplasma die Stätten der enzymatischen Reduktion sind, sowie das Bestreben, aus dem Reihenkomplex des Stoffwechsels einen Reaktionsabschnitt isoliert darzustellen, führte zur Verwendung der Homogenatmethode. Homogenate bestehen aus einer Lösung löslicher Zellbestandteile und einer Aufschwemmung unlöslicher Teilchenkomponenten einschliesslich der Mitochondrien und sekretorischer Granula. Potter und seine Mitarbeiter hatten gefunden, dass Reaktionen, die in der lebenden Zelle stattfinden, auch in dieser zellfreien Preperation des Protoplasmas vor sich gehen (35, 36). Wenn bei dieser Methode auch die Bedingungen bezüglich der Temperatur usw. optimal gehalten werden, dann ist es möglich, die Reaktionsglieder so lange mit einem physiologischen Milieu zu umgeben, bis die endogene Sauerstoffaufnahme stattgefunden hat. Will man, wie in unseren Versuchen, nur ein Enzym messen, dann müssen die anderen Fermente durch Hemmstoffe oder Auswaschen ihrer Substrate ausgeschaltet werden. Mit dieser Methode kann somit eine Reaktion isoliert dargestellt und ihr Mechanismus studiert werden. Die Enzymaktivitäten können einzeln geprüft werden durch Zugabe bestimmter Co-Faktoren und Substraten (15, 16, 47).

Ein Homogenisator besteht aus einem dickwandigen Reagenzglas, dessen innerer Durchmesser dem äusseren einer Pistill angepasst ist. Der Form nach ist es

eine dickwandige Glasröhre von 6 cm Länge, an dessen unterem Teil ein 20 cm langer Glasstab angeschmolzen ist. Diese Pistill wird durch einen Elektromotor zum rotieren gebraucht. Das untere Ende ist zweckmässigerweise mit tropfenartigen Ausbuchtungen versehen, um eine gröbere Oberfläche zu erhalten, die das Zellgewebe besser zerkleinert. Die feinere Zerteilung geschieht dann zwischen den Wänden der beiden Teile.

METHODIK

Den Versuchstieren, weissen Mäusen, meist Männchen, wurde eine ihrem Körpergewicht entsprechende Menge einer Verdünnung von Tetrachlorkohlenstoff (5.0 g ad 100.0 ml mit Olivenöl) subcutan injiziert. Die verwendete Dosis erwies sich als ausreichend, eine - nicht zu ausgedehnte - zonale zentrilobuläre Nekrose zu erzeugen (s. Mikroaufnahmen der histologisch kontrollierten Schnitte). Die angegebenen Dosierung von 0.1/100.0 g Körpergewicht - wurde hauptsächlich verwendet und blieb für eine Versuchsreihe konstant.

Nach der Injektion des Lebergiftes wurde den Tieren alles Futter entzogen, Wasser dagegen belassen. Nach etwa 20 - 24 Stunden wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, die Leber möglichst schnell entnommen und nach Bestimmung des Gewichts, in einer dafür bereitgestellten kalten Potterlösung gebracht (1.15 % Kaliumchlorid und 0.003 % Natriumbikarbonat). Anschliessend wurde die Leber in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerrieben.

Ausführung:

In die Thunberggröhrchen wird das Reaktionsgemisch gegeben, das Homogenat in die Kipper. Die Schliffe der Röhrchen wurden vorher mit Vakuumfett sorgfältig eingefettet, die Kipper so gestellt, dass sich ihre Bohrung mit dem Ansatzrohr deckt. Nachdem mittels einer Wasserstrahlpumpe 5 Minuten evakuiert wurde, dreht man die Kipper um die Röhrchen dicht zu verschliessen. Es empfiehlt sich, 1 - 2 Glasperlen in die Röhrchen zu geben und beim Evakuieren mässig zu schütteln. Die verschlossenen Röhrchen kommen dann in ein Wasserbad, dessen Temperatur auf 37°C eingestellt und durch einen Thermostaten konstant gehalten wird. Man wartet 3 - 4 Minuten für die Aequilibration, darauf wird durch Umkippen der Thunberggröhrchen das Homogenat mit dem Reaktionsgemisch vermengt. Dieser Zeitpunkt gilt als Beginn der Bestimmungen und wird notiert.

Bei der visuellen Ablesung der Entfärbungszeiten bedient man sich am besten zum Vergleich der Farbenintensität eines mit demselben Volumen gefüllten Reagenzglases, welches nur ein Zehntel der Methylenblaumenge enthält. Die Stärke dieser Farbe entspricht einer 90 % Reduktion. Während des Reduktionsvorganges wurden die Proben geschüttelt; sie waren mit einer besonderen Vorrichtung an der Warburg-Apparatur angebracht.

Vorläufiger Ansatz

Röhrchen	I	II	III	IV
Phosphatpuffer pH 7.4	1.0	1.0	1.0	1.0
Succinat	0.3	0.3	0.3	---
1.15 % CaCl_2 - AlCl_3	0.3	0.3	0.3	0.3
15 % Homogenat	0.3	0.2	0.1	0.3
Methylenblau 1 : 10 000	1.0	1.0	1.0	1.0

Die Ergebnisse mit diesem Verdünnungsansatz entsprachen nur im Prinzip den Erwartungen. Eine Oxydation der Bernsteinsäure konnte zwar festgestellt werden, jedoch erst nach mehreren Stunden. Für eine Enzymaktivitätsbestimmung liefern solche Entfärbungszeiten keine brauchbaren Werte, denn es ist unmöglich, bei einer so langen Versuchsdauer die Bedingungen für das Enzym konstant optimal zu halten. Wir mussten deshalb die Konzentration des Reaktionsgemisches ändern, entweder durch Erhöhung der Substratmenge oder der Wasserstoffacceptorenverdünnung. In einer versuchsweisen Verdünnungsreihe wurde die passende Methylenblau-Konzentration ermittelt. Bei sonst gleichem Ansatz, nur die Homogenatmenge war in allen Röhrchen gleich, wurde stufenweise Methylenblau von 1 : 20 000 bis 1 : 1000 Verdünnung geprüft. Die Werte an der oberen Grenze der Verdünnung lieferten Entfärbungszeiten von maximal 2 Minuten. Die Reduktionszeiten waren dadurch sehr schwer zu differenzieren, eine Methylenblau-Konzentration in dieser Verdünnung konnte deshalb nicht in Frage kommen.

Die Entfärbungszeiten bei den letzten unteren Werten der Wasserstoffacceptorenverdünnung zwischen 1 : 2000 und 1 : 1000, lagen zwischen 10 bis 15 Minuten und für eine Ablesung sehr übersichtlich. Aus diesem Grunde wurde die Verdünnung von 1 : 1000 für die Versuche verwendet. Schliesslich wurde für das Homogenat eine 10 % Konzentration genommen; Kalzium und Aluminiumchlorid weggelassen.

Versuchsansatz

Röhrchen	I	II	III	IV
Homogenat 10 %	0.3	0.3	0.3	0.3
Methylenblau 1 : 1000	0.2	0.4	0.6	0.2
Succinat	0.3	0.3	0.3	---
Aqua dest.	0.8	0.6	0.4	0.8
Phosphatpuffer pH 7.4	1.0	1.0	1.0	1.0

ERGEBNISSE DER THUNBERGVERSUCHE

Sämtliche Ergebnisse der Thunberg-Methylenblau-Versuche zeigen eine deutliche Abnahme der Bernsteinsäuredehydrase in den mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Mäusen.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die Reaktionen im Homogenat aus vergifteten Lebern verzögert, da die Entfärbung des Methylenblau wesentlich länger dauerte. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase verringert ist.

TABELLE I

Röhrchen	I	II	III	IV	
Kontrolltiere	8,1 $\pm$ 1,4	17,4	27,8	--	Mittelwert aus 8 Versuchen
20 - 24 Stunden p. inj.					
0,1 g/100 g Tier	13,0 $\pm$ 2,6	25,7	40,1	--	Mittelwert aus 7 Versuchen
60 - 72 Stunden p. inj.					
0,1 g/100 g Tier	7,0 $\pm$ 2,3	20,4	31,0	--	Mittelwert aus 5 Versuchen

Ansatz für die Warburg-Versuche

0.05 molares Na-Succina pH 7.4	0.3 ccm
0.33 molarer Phosphatpuffer pH 7.4	1.0 ccm
Cytochrom C	0.4 ccm
0.004 molares CaCl_2	0.3 ccm
0.004 molares AlCl_3	0.3 ccm
5 %-iges Leberhomogenat in H_2O	0.2 ccm
Aqua dest.	0.5 ccm

Gesamtvolumen: 2.0 ccm

10 %-iges NaOH in Filterpapier

Temperatur: 37° C

ERGEBNISSE DER WARBURGVERSUCHE

Bei der Verwendung von Cytochrom C als Wasserstoffacceptor zeigen die Abbildungen ebenfalls eine merkliche Abnahme der Bernsteinsäuredehydrase in den geschädigten Lebern.

Während die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in dem Homogenat aus normalen Lebern für die Versuchsdauer nahezu konstant bleibt, fällt sie in den vergifteten Lebern mässig rasch ab.

Um die manometrischen Werte der O_2 -Aufnahme besser darstellen zu können, wurden die Ergebnisse der Warburg-Versuche durch den sogenannten 10/20 Quotienten ausgedrückt, der in übersichtlicher Weise die O_2 -Aufnahme durch 20 mg nasses Lebergewebe in einer Zeitspanne von 10 Minuten veranschaulicht. Das nach dem Vorschlag von Potter angewandte Bezugssystem berücksichtigt, dass das durchschnittliche Trockengewicht der Leber bei 30 % des Nassgewichtes liegt, demnach findet sich der 10/20 Quotient in der Nähe des Q_{O_2} (37). Denn Q_{O_2} berechnet sich folgendermassen:

$$Q_{10/20} \times 6 \times \frac{1}{20} \times \frac{100}{30} = Q_{O_2}$$

Es ist sehr schwierig, bei veränderter Zellstruktur des pathologischen Gewebes die Versuchsergebnisse genau auszudrücken. Wir waren daher bemüht, uns eines zuverlässigen Bezugssystems zu bedienen, das bei Störungen im Zellgeschehen, bedingt durch pathologische Prozesse, einigermassen genaue Relationen liefert.

Den Messmethoden für die Enzymaktivität sollte ein ebenso exaktes Bezugssystem entsprechen. Einmal kann dies durch Bestimmen der Trockengewichte geschehen. Es können zu diesem Zweck aber auch der Gesamt-N, möglicherweise sogar die Desoxyribonucleinsäure bestimmt werden.

In unserem Falle haben wir die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase sowohl auf das Nass-, wie auch auf das Trockengewicht, aber auch auf das ganze Organ und 1 g Maus bezogen.

Die Tabelle II zeigt den Sauerstoffverbrauch in cmm durch Dehydrierung von Succinat im Ansatz nach Potter.

Versuch 24 Stunden nach s. c. Injektion der angegebenen Menge Tetrachlorkohlenstoff.

TABELLE II

	Kontrolle	Tetrachlorkohlenstoff		
		0,05g/100g	0,1g/100g	0,2g/100g
Q 10/20 d. h. Verbrauch durch 20 mg nasses Gewebe in 10 Min.	82	31	53	44
Q _{O₂}	69	--	54	39
O ₂ durch die ganze Leber in 20 Min.	10600	4100	6100	4000
O ₂ pro 1 g Maus in 20 Min.	395	150	265	260

Die Tabelle III zeigt den durchschnittlichen Verbrauch von Sauerstoff durch 20 mg nasses Lebergewebe in 10 Minuten (Q 10/20) bei Dehydrierung von Succinat im Warburg-Versuch. Mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftete Mäuse, 24 und 48 Stunden nach s. c. Injektion.

TABELLE III

Q 10/20	Kontrolle	Tetrachlorkohlenstoff		
		0,05g/100g	0,1g/100g	0,2g/100g
20 - 24 Std.	86	33	45	28
44 - 48 Std. p. inj.	86	49	62	53

DISKUSSION

Unsere Versuche hatten das Ziel die enzymatische Leistung der Zellen im pathologischen Zustand zu prüfen. Wir bestimmten die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase in den durch Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Lebern von Mäusen.

Wir sind dabei von den Überlegungen ausgegangen, dass die gefundenen morphologischen Veränderungen in eine Beziehung zu den Lebererkrankungen des Menschen gebracht werden dürfen. Histologische Vergleiche konnten dies bei manchen Krankheiten der Leber auch bestätigen.

Wenn wir nun gefunden haben, dass das Reduktionsvermögen der Bernsteinsäuredehydrase vermindert ist, so können wir doch über das zellchemische Geschehen wenig aussagen. Bekanntlich können eine Reihe von Faktoren für eine Enzymschädigung in Betracht kommen (40). So kann Tetrachlorkohlenstoff als Inhibitor angesehen werden, der sich zwischen Substrat und Enzym legt, somit das Enzym in seiner Funktion hemmt. Wissen wir doch, wie Gifte Cytochrom hemmen können, dass dann im Spektrum als reduziertes Cytochrom erscheint. Diese Erkenntnis sowie die Tatsache, dass wir bei den Thunbergversuchen keine

einheitlichen Beobachtungen machen konnten, liessen die Annahme als berechtigt erscheinen, es muss noch ein weiteres Glied im succino-dehydrierenden System gestört sein. Auch ist eine Trennung der Succinodehydrase in ein Apo- und Co-Ferment bisher nicht gelungen, weshalb wir über die Strukturveränderung innerhalb des Moleküls keine Vorstellung haben.

Wie es zu einer Minderung der enzymatischen Leistung kommt, als deren Stätte das Protoplasma gilt, kann auch mit einer Störung der Permeabilität erklärt werden. Der schichtförmige Aufbau des Protoplasma und Plasmalemm besitzen eine selektive Durchgängigkeit für Auf- und Abbaustoffe im Zellstoffwechsel. Nach der Lipoidtheorie kann man annehmen, dass Plasmalemm aus Lipoidschichten besteht und der Eintritt von Stoffen von der Öllöslichkeit bestimmt wird. Wenn nun besondere Substanzen (Gifte) diese selektive Fähigkeit stören, wird auch das physiologische Milieu für den Zellmechanismus verändert.

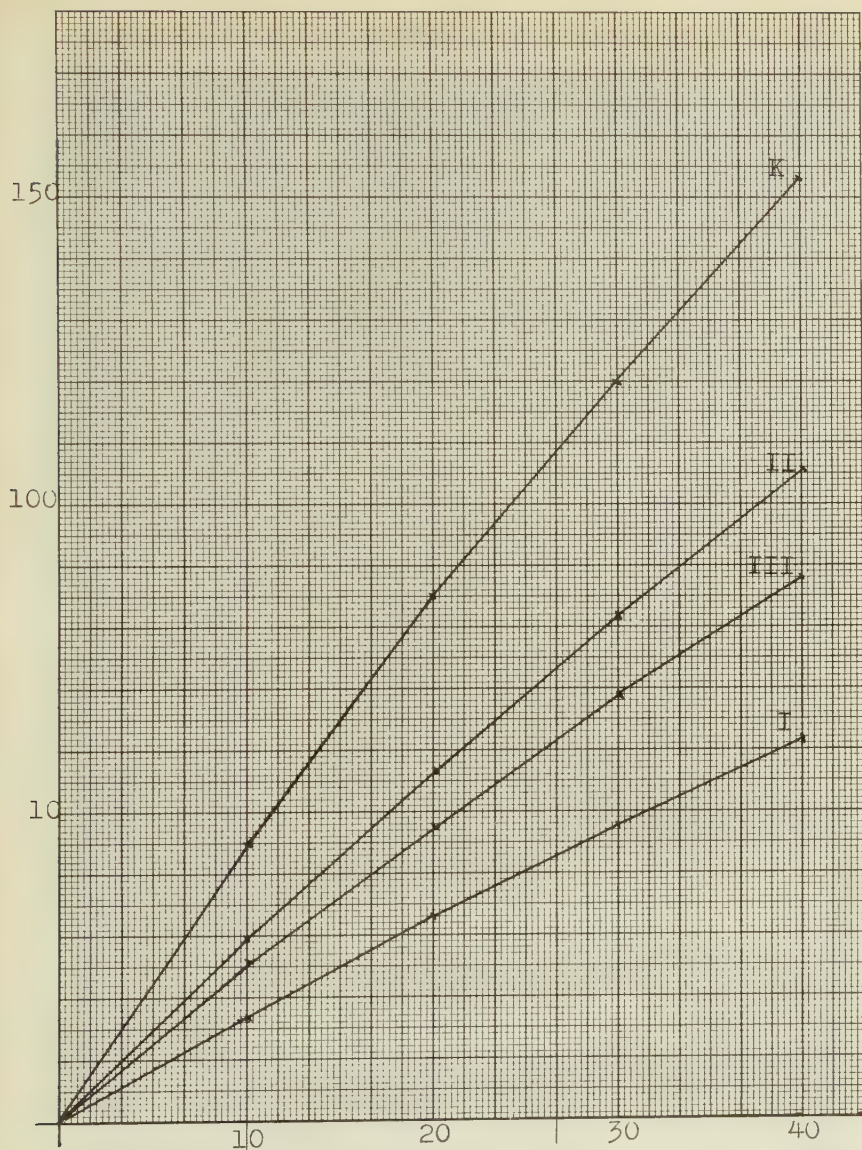
Abschliessend darf vielleicht gesagt werden, die enzymatischen Störungen wie sie bei pathologischen Veränderungen vorliegen, sollten im Zusammenhang mit anderen Fermenten gesehen werden. Es müssten eine Reihe der im Leberstoffwechsel beteiligten Fermente geprüft werden, um der Klinik vielleicht damit eines Tages verwendbare Erkenntnisse zu liefern.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde erwartet, dass bei einer toxisch geschädigten Leber, dem Bild der veränderten Zellstruktur eine Störung des Stoffwechsels entspricht. Unsere Untersuchungen darüber beschränkten sich auf die Bernsteinsäuredehydrase. Die Versuchstechnik für die Bestimmungen waren die Thunberg- und Warburgtechnik.

Wir konnten feststellen:

1. Bei Vergiftungen von Mäusen mit Tetrachlorkohlenstoff fällt in den Lebern die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase auf etwa 50 % des normalen Wertes.
2. Die verwendete Dosis 0,1/100,0 g erzeugte eine histologisch nachgewiesene zonale Nekrose in der Leber.
3. Aus den Ergebnissen der Thunbergversuche angenommen werden kann, dass die Bernsteinsäuredehydrase selber an dem Abfall nicht beteiligt ist.
4. Hinweise vorliegen, dass ein weiteres Glied im succinatdehydrierenden System durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigt ist.



3. Versuch

Ordinate: Sauerstoffverbrauch in cmm

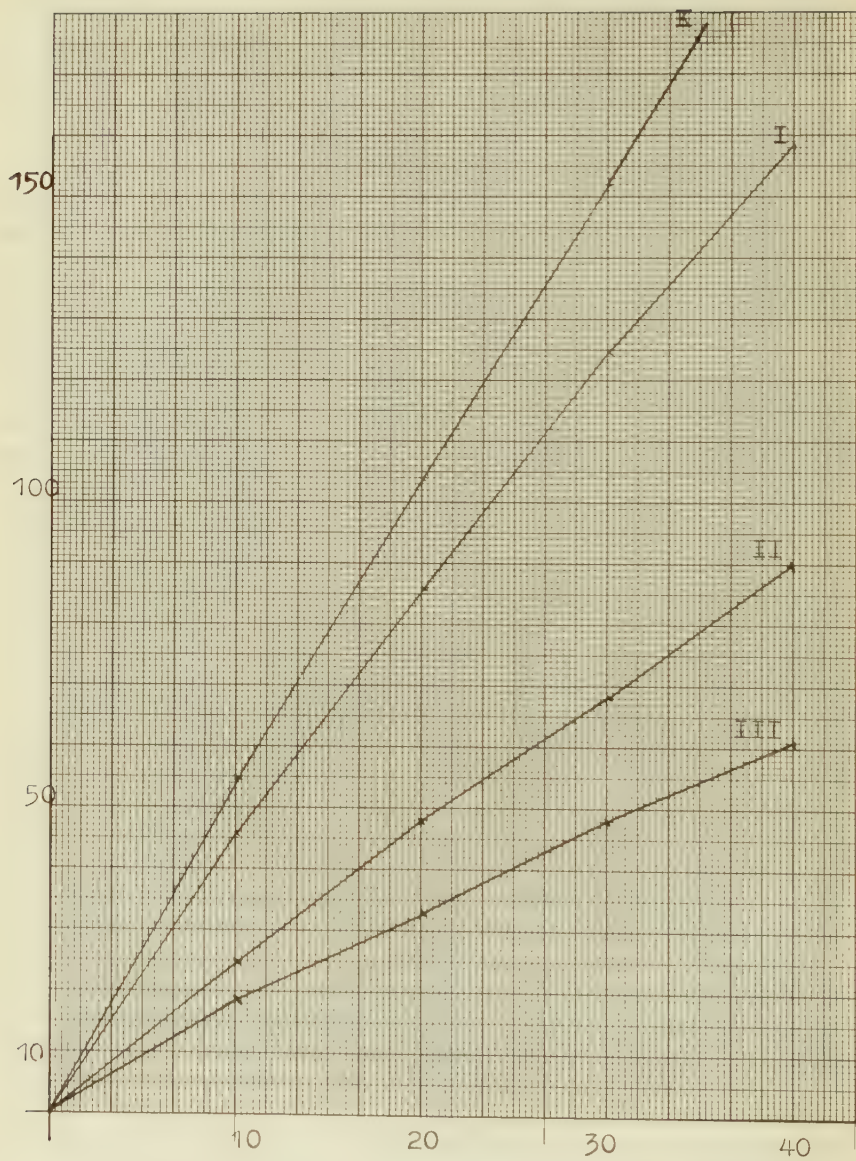
Abszisse: Zeit in Minuten (Kurve K: Kontrolltier)

I.: 0,05 g)

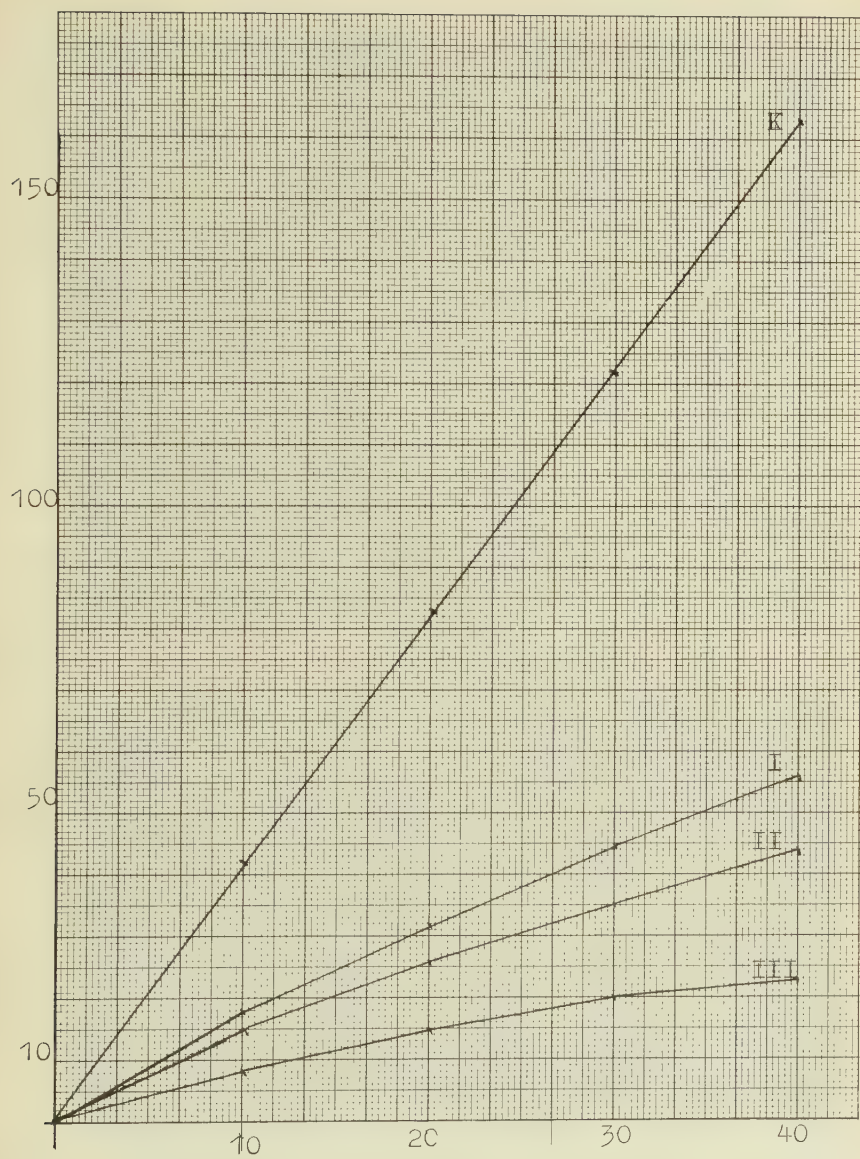
II.: 0,1 g)

III.: 0,2 g)

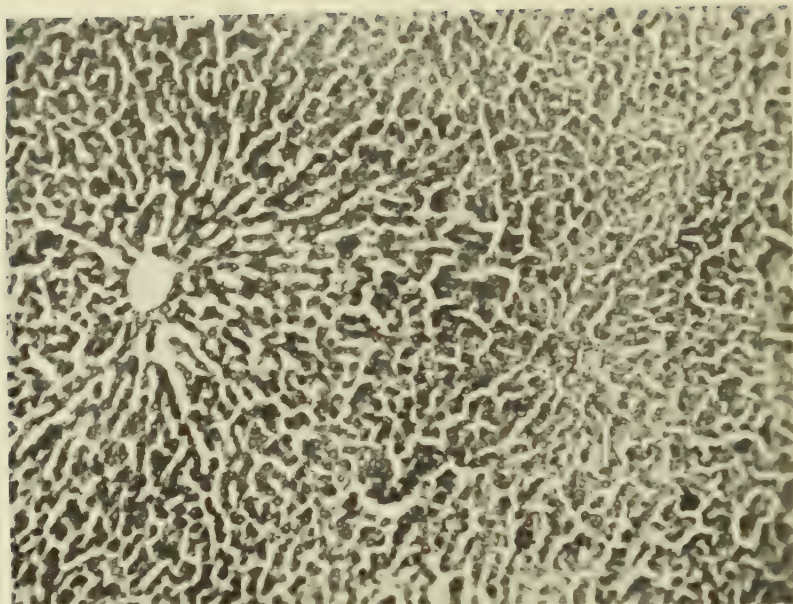
Tetrachlorkohlenstoff pro 100 g Tier; 20 - 24 Stunden vor dem Versuch



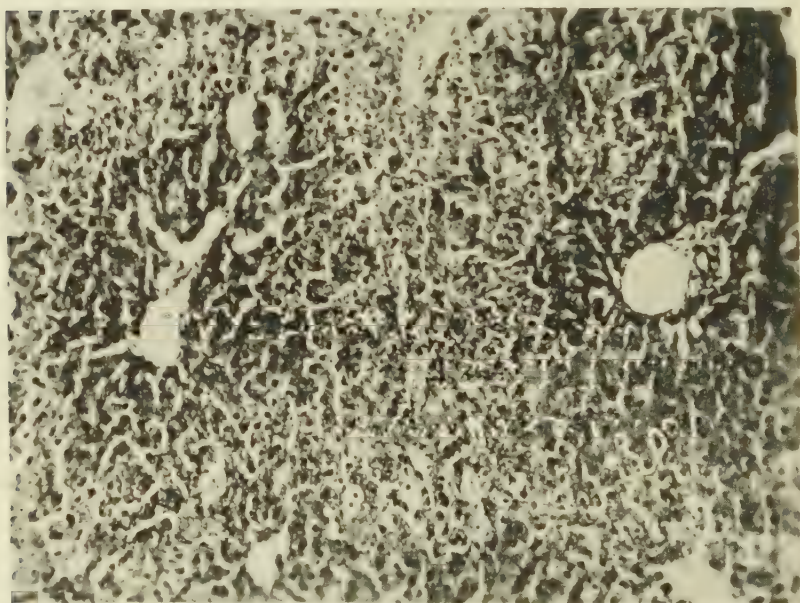
4. Versuch



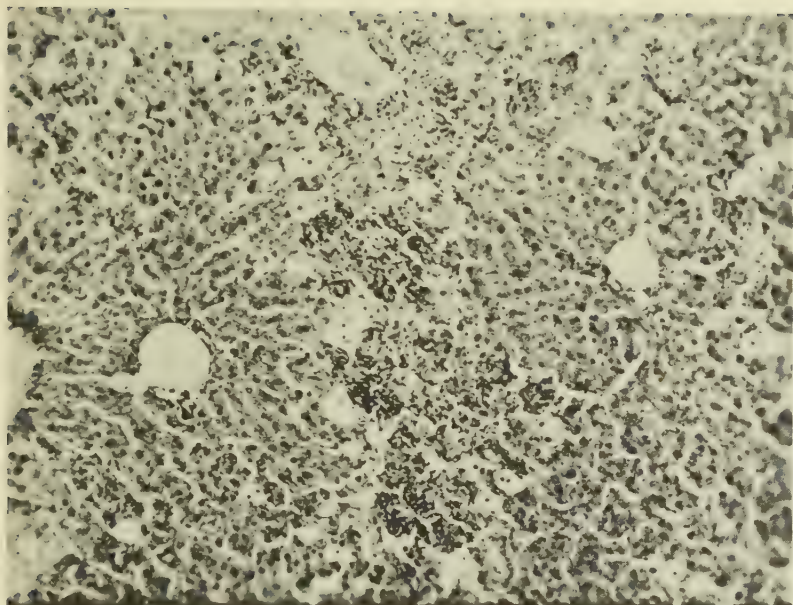
6. Versuch



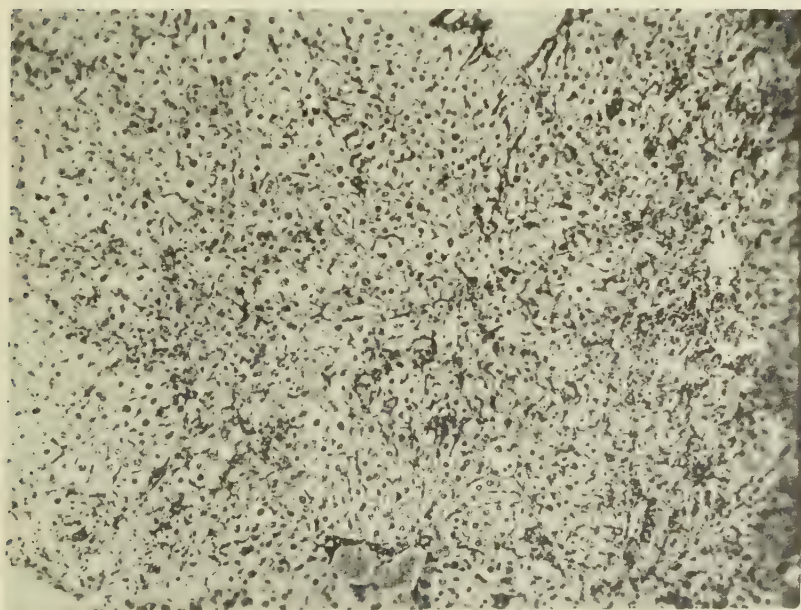
Kontrolltier



0.05 g Tetrachlorkohlenstoff



0.1 g Tetrachlorokohlenstoff



0.2 g Tetrachlorokohlenstoff

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ajl, S. J., Hart, W. R., Werkmann, C. H.:
Enzymologie 14; 1-7 (1950)
2. Baldwin, E.:
"Dynamic Aspects of Biochemistry", Cambridge
(1950)
3. Bail, E. G., Cooper, Q.: J. Biol. Chem. 180; 113-124 (1924)
4. Bielig, H. J., Kauschke, C. A. und Haadick, H.:
Z. Naturforschg. 4b; 80 (1949)
5. Banner, W. D.:
J. Nature 156; 757-58 (1950)
6. Buchmann, J., Skami, W., Gurin, S., Wilson, D.:
J. Biolog. Chem. 159; 695 (1945)
7. Cameron, G. R., Karunaratne, W. A.:
J. Path. and Bact. 42; 1 (1936)
8. Chantrenne, H.:
Enzymologie II; 213 (1944)
9. Dible, J. H. and McMichael, J.:
Brit. J. Vener. Dis. 102 (1943)
10. Doerr, W. und v. Lüttichau, E.:
Kl. Wschr. 27; 754 (1949)
11. Edelbacher, S. und Leuthardt, F.:
Lehrbuch der physiol. Chemie Zürich 1952
12. Fahmy, A. R. and Walsh, E. O. F.:
Biochem. J. 51; 55 (1951/52)
13. Fred, R. D. and Knight, S. C.:
Science (New York) 109; 169 (1949)
14. Fischer, F. G.:
Ber. Chem. Ges. 60; 2260 (1927)
15. Frunder, H.:
Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 291, Bd.
(1953)
16. Frunder, H. und Friedel, W.:
Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 295, Bd.
(1953)
17. Hade, H. O.:
Arch. Biochem. 2; 97 (1943)
18. v. Hayek, H.:
Naturwiss. 37; 262 (1950)
19. Himsworth, H. P.:
"The Liver and its Diseases" (1954)

20. Hedgeboom, G., Schneider, W., Pallade, G.:
J. Biol. Chem. 172; 619 (1948)
21. Keilin, D. and Hartree, E.F.:
Proc. Roy. Soc. 144; 787 (1939)
22. Keilin, D.:
Proc. Roy. Soc. (B) 106; 418 (1930)
23. Kun, E. and Abood, L.G.:
Science (New York) 109; 144 (1949)
24. Krebs, H. A.:
Biochem. J. 29; 1620 (1935)
25. Lang, K. und Siebert, G.:
Biochem. Z. 322; 196-204 (1951)
26. Lanson, P.D. and Wing, R.J.:
J. Biol. Chem. 69; 349 (1926)
27. Lehninger, A.:
J. Biol. Chem. 159; 695 (1945)
28. Lichtmann, L. L.:
"Diseases of liver and gallbladder and bile-ducts."
Philadelphia 1949
29. Leloir, L., Munos, J.: J. Biol. Chem. 153; 53 (1944)
30. Lynen, F.:
Ann. d. Chemie 558; 57 (1947)
31. Mann, P.J. and Quastel, I. K.:
Biochem. J. 35; 502-517 (1941)
32. Moon, V. H.:
Arch. Path. 18; 381 (1949)
33. Monehouse, M. G., Winzler, R. J.:
J. Biol. Chem. 168; 717 (1949)
34. Neumann, K. H. und Koch, G.:
Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 295. Bd.
(1953)
35. Potter, V. R. und Elvehjem, C. H.:
J. Biol. Chem. 114; 495 (1936)
36. Potter, V. R. und Klug, H.:
Arch. Biol. Chem. 12; 241 (1947)
37. Potter in Umbreit, W. W., Burris, R. H. und Stauffer, J. F.:
"Manometric Techniques and Tissue Metabolism",
Minneapolis; (1949)

38. Rhoyl, H.L., Moxon, A., Peterson, D.F. and Potter, V.R.:
Arch. Biochem. 28; 253-59 (1950)
39. Scott, C.R.:
Federation Proc. 9; 225-26 (1950)
40. Sprinz, H. und Waldschmidt-Leitz, E.:
Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 293. Bd.
(1953)
41. Szent-György, A. und Mitarb.:
Conf. on liver injury (1951)
42. Wood, H., Werksman, C., Hemingway, A.A., Nier:
J. Biol. Chem. 139; 483 (1941)
43. Weinman, E.D.:
Arch. Biochem. 2; 97 (1942)
44. Wieland, H.:
Ber. Chem. Ges. 46; 3335 (1913)
45. Wieland und Frage, K.:
Liebigs Ann. 47; 72 (1930)
46. Waugh, Th.D.:
Science (New York) 107; 275 (1948)
47. Warren, C.O.:
J. biol. Chemistry 156; 559 (1944)

Allen meinen Lehrern fühle ich mich zu tiefem Dank verpflichtet, Herrn Professor Dr. N. ZÖLLNER insbesondere für die gütige Überlassung der Arbeit und die mir dazu gegebenen Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 28. Juli 1927 in Dillingen/Donau geboren, trat ich 1939 nach sechsjährigem Besuch der Volksschule in Dillingen/Donau und Kaufbeuren in die Aufbauschule in Kaufbeuren über. Im Februar 1945 wurde ich zum Arbeits- und Wehrdienst einberufen. Nach Kriegsende Fortsetzung meiner Schulausbildung an der nunmehrigen Oberschule in Kaufbeuren, wo ich 1947 das Abitur ablegte.

Im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der philosophisch-theologischen Hochschule in Dillingen/Donau. 1948 setzte ich mein vorklinisches Medizinstudium in der in Regensburg sich damals befindlichen medizinischen Aussenstelle der Universität München fort und bestand mein Physikum 1950.

Die klinischen Semester belegte ich an der Universität München und unterzog mich 1953 mit Erfolg der medizinischen Staatsprüfung.

Nach meiner Pflichtassistentenzeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität München begann ich mit meiner Fachausbildung an der Privatklinik Dr. Haas von 1955 bis 1957.

Danach arbeitete ich als Assistent an einem amerikanischen Luftwaffen-Hospital in Hahn/Hunsrück, lediglich unterbrochen zur Ableistung meines Landvierteljahres, wo ich zur Zeit noch angestellt bin.

